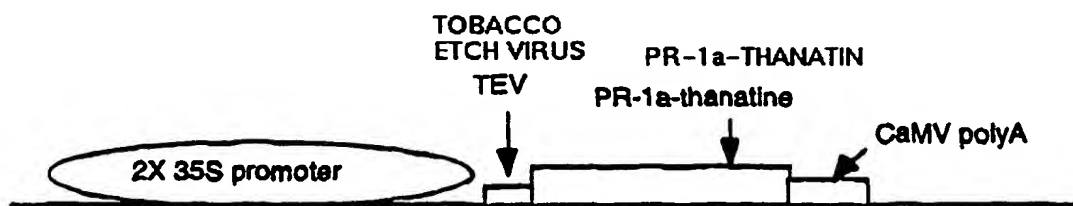


<p><b>(51) International patent classification<sup>6</sup>:</b></p> <p>C12N 15/82, C07K 14/435, C12N 15/62, C12Q 1/68, A01H 5/00</p>	<p><b>A1</b></p>	<p><b>(11) International publication number:</b> WO 99/24594</p> <p><b>(43) International publication date:</b></p> <p>20 May 1999 (20.05.99)</p>
<p><b>(21) International application number:</b> PCT/FR98/02375</p> <p><b>(22) International filing date:</b> 6 November 1998 (06.11.98)</p> <p><b>(30) Data relating to the priority:</b></p> <p>97/14,263 7 November 1997 (07.11.97) FR</p> <p><b>(71) Applicant (for all designated States except US):</b> RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR).</p> <p><b>(72) Inventors; and</b></p> <p><b>(75) Inventors/Applicants (US only):</b> FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint Cyr au Mont d'Or (FR). DEROSE, Richard [US/FR]; 31, rue du Bois Guillaume, F-91000 Evry (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p><b>(74) Representative:</b> TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro - DPI, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).</p>	<p><b>(81) Designated states:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Published</b> With the International Search Report.</p>	

As printed

(54) Title: GENE CODING FOR THANATIN, VECTOR CONTAINING SAME AND RESULTING TRANSFORMED DISEASE-RESISTANT PLANTS

(54) Titre: GENE CODANT POUR LA THANATINE, VECTEUR LE CONTENANT ET PLANTES TRANSFORMEES OBTENUES RESISTANTES AUX MALADIES



## (57) Abstract

The invention concerns a DNA sequence coding for thanatin, a vector containing it for transforming a host organism and the transformation method. More particularly the invention concerns the transformation of plant cells and plants, the drosomycin produced by the plants providing them with resistance to diseases, particularly of fungal origin.

## (57) Abrégé

La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la thanatine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation. L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la drosomycine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

# **ONLY FOR INFORMATION**

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

Gene encoding thanatin, vector containing it and  
disease-resistant transformed plants obtained

The subject of the present invention is a DNA  
5 sequence encoding thanatin, a vector containing it for  
the transformation of a host organism, and the method  
of transforming the said organism.

The invention relates more particularly to  
the transformation of plant cells and plants, the  
10 thanatin produced by the transformed plants conferring  
on them resistance to diseases, in particular of fungal  
origin.

An increasing need already exists for making  
plants resistant against diseases, in particular fungal  
15 diseases, in order to reduce, or even eliminate, the  
need for treatment with antifungal protection products,  
with a view to protecting the environment. One means of  
increasing this resistance to diseases consists in  
transforming the plants so that they produce substances  
20 capable of providing their defence against these  
diseases.

Various substances of natural origin, in  
particular peptides, are known which exhibit  
bactericidal or fungicidal properties, in particular  
25 against the fungi responsible for plant diseases.  
However, the problem consists in finding such

substances which not only can be produced by transformed plants, but can still preserve their bactericidal or fungicidal properties and confer them on the said plants. For the purposes of the present invention, bactericidal or fungicidal is understood to mean the actual bactericidal or fungicidal properties and the bacteriostatic and fungistatic properties.

Thanatin is a peptide produced by bacterial induction on adult *Psodius sp*, preferably *maculiventris*. Its preparation by bacterial induction is described in patent application FR 2,733,237, as well as its antifungal and antibacterial properties *in vitro*.

After having first identified the thanatin gene, it was also found that it could be inserted into a host organism, in particular a plant, in order to express the thanatin and confer on the said host organism properties of resistance to fungal diseases and to diseases of bacterial origin, providing a particularly advantageous solution to the problem stated above.

The subject of the invention is therefore first a nucleic acid fragment encoding thanatin, a chimeric gene comprising the said fragment encoding thanatin as well as heterologous regulatory elements at the 5' and 3' positions which can function in a host organism, in particular in plants, and a vector for transforming the host organisms containing this

chimeric gene, and the transformed host organism. It also relates to a transformed plant cell containing at least one nucleic acid fragment encoding thanatin and a disease-resistant plant containing the said cell, in particular regenerated from this cell. It finally relates to a method of transforming plants to make them resistant to diseases, in which method a gene encoding thanatin is inserted by means of an appropriate vector.

Thanatin is understood to mean according to the invention any peptide comprising essentially the peptide sequence of 11 amino acids which is described in patent application FR 2,733,237, as well as the equivalent homologous sequences in which certain amino acids are replaced by different but equivalent amino acids at sites which do not induce substantial modification of the antifungal or antibacterial activity of the said homologous sequence. Peptide sequence comprising essentially the peptide sequence described in patent application FR 2,733,237 is understood to mean not only the sequence defined by the sequence identifier No. 1 (SEQ ID NO 1), but also such a sequence comprising at either of its ends, or at both, peptide residues necessary for its expression and targeting in a host organism, in particular a plant cell or a plant.

Thanatin is a peptide of formula (I):

Xaa-Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys-Xab

(I)

in which:

Xaa is  $\text{NH}_2$  or a variable residue having a sequence comprising from 1 to 10 amino acids, and

Xab is OH or a variable residue having a  
5 sequence comprising from 0 to 5 amino acids.

Advantageously, when Xaa comprises at least one amino acid, the latter is one of the 20 base amino acids and more particularly chosen from the group comprising Gly, Ser, Lys, Pro and Val. When Xab  
10 comprises at least one amino acid, the latter is one of the 20 base amino acids and more particularly chosen from the group comprising Gln, Arg and Met.

According to a preferred embodiment of the invention, the two cysteine residues of the peptide of  
15 formula (I) form an intramolecular disulphide bridge.

The present invention therefore relates first to a nucleic acid, in particular a DNA, fragment encoding the thanatin defined above. It may be, according to the invention, a fragment isolated from  
20 *Psodius sp*, preferably *maculiventris*, or alternatively a derived fragment, suitable for the expression of thanatin in the host organism where the peptide will be expressed. The nucleic acid fragment may be obtained using standard methods of isolation and purification,  
25 or alternatively by synthesis according to the customary techniques of successive hybridizations of synthetic oligonucleotides. These techniques are in particular described by Ausubel et al.

According to the present invention, "nucleic acid fragment" is understood to mean a nucleotide sequence which may be of the DNA or RNA type, preferably of the DNA, in particular cDNA, especially  
5 double-stranded, type.

According to one embodiment of the invention, the nucleic acid fragment encoding thanatin comprises the DNA sequence described by the sequence identifier No. 1 (SEQ ID NO 1), a homologous sequence or a  
10 sequence complementary to the said sequence.

Advantageously, the nucleic acid fragment according to the invention comprises the DNA sequence described by the sequence identifier No. 2 (SEQ ID NO 2), a homologous sequence or a sequence complementary  
15 to the said sequence.

"Homologous" is understood to mean according to the invention a nucleic acid fragment having one or more sequence modifications relative to the nucleotide sequence described by the sequence identifier No. 1 or  
20 No. 2 and encoding thanatin. These modifications may be obtained according to the customary mutation techniques, or alternatively by choosing the synthetic oligonucleotides used in the preparation of the said sequence by hybridization. Given the multiple  
25 combinations of nucleic acids which may lead to the expression of the same amino acid, the differences between the reference sequence described by the sequence identifier No. 1 or No. 2 and the homologue

may be great, especially since a DNA fragment of less than 100 nucleic acids in size, which can be produced by synthesis, is involved. Advantageously, the degree of homology will be at least 70% relative to the  
5 reference sequence, preferably at least 80%, more preferably at least 90%. These modifications are generally neutral, that is to say that they do not affect the primary sequence of the resulting thanatin.

The present invention also relates to a  
10 chimeric gene (or an expression cassette) comprising a coding sequence as well as heterologous regulatory elements at the 5' and 3' positions which can function in a host organism, in particular plant cells or plants, the coding sequence comprising at least one DNA  
15 fragment encoding thanatin as defined above.

Host organism is understood to mean any higher or lower mono- or pluricellular organism into which the chimeric gene according to the invention may be introduced, for the production of thanatin. It  
20 consists of in particular bacteria, for example *E. coli*, yeasts, in particular of the genera *Saccharomyces* or *Kluyveromyces*, or preferably plant cells and plants.

"Plant cell" is understood to mean according  
25 to the invention any cell derived from a plant and which may constitute undifferentiated tissues such as calli, and differentiated tissues such as embryos, plant portions, plants or seeds.



"Plant" is understood to mean according to the invention any differentiated multicellular organism capable of photosynthesis, in particular monocotyledones or dicotyledones, more particularly  
5 cultivated plants intended or otherwise as animal feed or for human consumption, such as maize, wheat, colza, soya bean, rice, sugar cane, beet, tobacco, cotton and the like.

The regulatory elements necessary for the  
10 expression of the DNA fragment encoding thanatin are well known to persons skilled in the art depending on the host organism. They comprise in particular promoter sequences, transcription enhancers, transit peptides, terminator sequences, including start and stop codons.  
15 The means and methods for identifying and selecting the regulatory elements are well known to persons skilled in the art.

The nucleic acid fragment according to the invention may also comprise a nucleic acid sequence  
20 fused in 5' and/or 3' to the sequence encoding thanatin, so as to obtain a "protein-thanatin" fusion protein, whose cleavage by the enzymatic systems of the host organism allows the release of thanatin. This thanatin-fused protein may be a signal peptide or a transit  
25 peptide which makes it possible to control and orient the production of thanatin in a specific manner in a part of the host organism, such as for example the cytoplasm, the cell membrane, or in the case of plants

in a particular type of tissue or in the extracellular matrix.

According to one embodiment, the transit peptide may be a signal for chloroplast or  
5 mitochondrial addressing, which transit peptide is then cleaved in the chloroplast or the mitochondria.

According to another embodiment of the invention, the signal peptide may be an N-terminal signal or "prepeptide", optionally in combination with  
10 a signal responsible for retaining the protein in the endoplasmic reticulum, or a peptide for vacuolar addressing or "propeptide". The endoplasmic reticulum is the site where operations of maturation of the protein produced, such as for example the cleavage of  
15 the signal peptide, are carried out by the "cellular machinery".

The invention relates more particularly to the transformation of plants. As regulatory promoter sequence in plants, there may be used any promoter  
20 sequence of a gene which is expressed naturally in plants, in particular a promoter of bacterial, viral or plant origin such as, for example, that of a gene for the small subunit of ribulose biscarboxylase (RuBisCO) or of a plant virus gene, for example that of  
25 cauliflower mosaic (CAMV 19S or 35S), or a promoter inducible by pathogens such as tobacco PR-1a or asparagus AoPRT-L, it being possible for any known suitable promoter to be used. Preferably, a regulatory

promoter sequence is used which promotes the overexpression of the coding sequence constitutively or inducibly by a pathogen attack, such as for example that comprising at least one histone promoter as  
5 described in application EP 0,507,698.

According to the invention, it is also possible to use, in combination with the regulatory promoter sequence, other regulatory sequences which are situated between the promoter and the coding sequence,  
10 such as transcription enhancers such as for example the tobacco mosaic virus (TMV) translation enhancer described in application WO 87/07644, or the tobacco etch virus (TEV) translation enhancer described by Carrington & Freed, or transit peptides, either single  
15 or double, and in this case optionally separated by an intermediate sequence, that is to say comprising, in the direction of transcription, a sequence encoding a transit peptide of a plant gene encoding a plastid localization enzyme, a portion of sequence of the N-  
20 terminal mature portion of a plant gene encoding a plastid localization enzyme, and then a sequence encoding a second transit peptide of a plant gene encoding a plastid localization enzyme consisting of a portion of sequence of the N-terminal mature portion of  
25 a plant gene encoding a plastid localization enzyme, as described in application EP 0,508,909. As transit peptide, there may be mentioned the signal peptide of the tobacco PR-1a gene described by Cornelissen et al.,

represented with its coding sequence by the sequence identifier No 3.

The sequence encoding the fusion protein signal peptide PR-1a-thanatin and this fusion protein  
5 also form part of the present invention. This sequence is in particular described by the sequence identifier No. 5, more particularly the coding part of this sequence, corresponding to bases 12 to 164.

As regulatory terminator or polyadenylation  
10 sequence, there may be used any corresponding sequence of bacterial origin, such as for example the nos terminator from *Agrobacterium tumefaciens*, or alternatively of plant origin, such as for example a histone terminator as described in application  
15 EP 0,633,317.

According to the present invention, the chimeric gene may also comprise a selectable marker suitable for the transformed host organism. Such selectable markers are well known to persons skilled in  
20 the art. They may be a gene for resistance to antibiotics, such as penicillin, or alternatively a gene for tolerance of herbicides for plants.

The present invention also relates to a cloning or expression vector for the transformation of  
25 a host organism containing at least one chimeric gene as defined above. This vector comprises, in addition to the above chimeric gene, at least one replication origin. This vector may consist of a plasmid, a cosmid,

a bacteriophage or a virus, transformed by the introduction of the chimeric gene according to the invention. Such transformation vectors, depending on the host organism to be transformed, are well known to  
5 persons skilled in the art and are widely described in the literature.

For the transformation of plant cells or plants, they may consist in particular of a virus which may be used for the transformation of developed plants  
10 and containing, in addition, its own elements for replication and expression. Preferably, the vector for transforming plant cells or plants according to the invention is a plasmid.

The subject of the invention is also a method  
15 of transforming host organisms, in particular plant cells, by integration of at least one nucleic acid fragment or a chimeric gene as defined above, which transformation may be obtained by any known appropriate means widely described in the specialist literature and  
20 in particular the references cited in the present application, more particularly by the vector according to the invention.

A series of methods consists in bombarding cells or protoplasts with particles to which the DNA  
25 sequences are attached. Another series of methods consists in using, as means of transferring into the plant, a chimeric gene inserted into a Ti plasmid from

*Agrobacterium tumefaciens* or an Ri plasmid from *Agrobacterium rhizogenes*.

Other methods may be used, such as microinjection or electroporation or alternatively  
5 direct precipitation by means of PEG.

Persons skilled in the art will make the choice of the appropriate method depending on the nature of the host organism, in particular the plant cell or the plant.

10 The subject of the present invention is also the host organisms, in particular plant cells or plants, transformed and containing an effective quantity of a chimeric gene comprising a sequence encoding the thanatin defined above.

15 The subject of the present invention is also the plants containing transformed cells, in particular the plants regenerated from transformed cells. The regeneration is obtained by any appropriate method which depends on the nature of the species, as for  
20 example described in the references above.

For the methods of transforming plant cells and of regenerating plants, the following patents and patent applications may be mentioned: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073,  
25 EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318,

US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442,174, EP 486,233,  
EP 486,234, EP 539,563, EP 674,725, WO 91/02071 and  
WO 95/06128.

The present invention also relates to the  
5 transformed plants derived from the cultivation and/or  
crossing of the above regenerated plants, as well as  
the seeds of transformed plants.

The plants thus transformed are resistant to  
certain diseases, in particular to certain fungal or  
10 bacterial diseases. Consequently, the DNA sequence  
encoding thanatin may be integrated with the main  
objective of producing plants resistant to the said  
diseases, thanatin being effective against fungal  
diseases such as those caused by *Cercospora*, in  
15 particular *Cercospora beticola*, *Cladosporium*, in  
particular *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, in  
particular *Fusarium culmorum* or *Fusarium graminearum* or  
by *Phytophthora*, in particular *Phytophthora cinnamomi*.

The chimeric gene may also advantageously  
20 comprise at least one selectable marker, such as one or  
more herbicide tolerance genes.

The DNA sequence encoding thanatin may also  
be integrated as a selectable marker during the  
transformation of plants with other sequences encoding  
25 other peptides or proteins of interest such as, for  
example, herbicide tolerance genes.

Such herbicide tolerance genes are well known  
to a person skilled in the art and are in particular

described in patent applications EP 115 673,  
WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 or WO 97/04103.

Of course, the transformed cells and plants  
according to the invention may comprise, in addition to  
5 the sequence encoding thanatin, other heterologous  
sequences encoding other additional peptides capable of  
conferring on the plant resistance to other diseases of  
bacterial or fungal origin.

The other sequences may be integrated by  
10 means of the same vector comprising a chimeric gene,  
which comprises a first sequence encoding thanatin and  
at least one other sequence encoding another peptide or  
protein of interest.

They may also be integrated by means of  
15 another vector comprising at least the said other  
sequence, according to the customary techniques defined  
above.

The plants according to the invention may  
also be obtained by crossing parents, one carrying the  
20 gene according to the invention encoding thanatin, the  
other carrying a gene encoding at least one other  
peptide or protein of interest.

Among the sequences encoding other antifungal  
peptides, there may be mentioned that encoding  
25 drosomycin, which is described in patent application FR  
2,725,992 and by Fehlbauer et al. (1994), and in the  
unpublished patent application FR 97 09115 filed on  
24 July 1997, or that encoding androctonin described in



patent application FR 2,745,004 and in unpublished  
patent application FR 97 10362 filed on 20 August 1997.

The examples below make it possible to  
illustrate the invention, the preparation of the  
5 sequence encoding thanatin, of the chimeric gene, of  
the integration vector and of the transformed plants.  
Figures 1 to 5 in the annex describe the schematic  
structures of some plasmids prepared for the  
construction of chimeric genes. In these figures, the  
10 different restriction sites are marked in *italics*.

#### **Example 1: Construction of the chimeric genes**

All the techniques used below are standard  
laboratory techniques. The detailed protocols of these  
15 techniques are in particular described in Ausubel et  
al.

#### **pRPa-MD-P: Creation of a plasmid containing the signal peptide of the tobacco PR-1a gene**

20 The two complementary synthetic  
oligonucleotides Oligo 1 and Oligo 2 below are  
hybridized at 65°C for 5 minutes and then by slowly  
reducing the temperature to 30°C for 30'.

25 Oligo 1: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC  
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 2: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA  
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

After hybridization between Oligo 1 and Oligo  
5 2, the DNA remaining single-stranded serves as a  
template for the Klenow fragment of polymerase I of *E.*  
*coli* (under the standard conditions recommended by the  
manufacturer (New England Biolabs)) for the creation of  
the double-stranded oligonucleotide starting from the 3'  
10 end of each oligo. The double-stranded oligonucleotide  
obtained is then digested with the restriction enzymes  
*SacII* and *NaeI* and cloned into the plasmid pBS II SK(-)  
(Stratagene) digested with the same restriction  
enzymes. A clone is then obtained comprising the region  
15 encoding the signal peptide of the tobacco PR-1a gene  
(SEQ ID NO 3).

**pRPA-PS-PR1a-tha: Creation of a sequence encoding  
thanatin fused to the signal peptide PR-1a without a  
20 nontranscribed region in 3'**

The two synthetic oligonucleotides with  
complementary sequences Oligo 3 and Oligo 4 based on  
the operating conditions described for **pRPA-MD-P**.

25 Oligo 3: 5' GGTTCCAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA CG 3'

Oligo 4:      5'      CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCACATCC  
TCTGGCACTT ACCAGTCCTC CTGTTGCAGT AGATGATTGG  
CACTGGC 3'

5 After hybridization between Oligo 3 and Oligo  
4, the DNA remaining single-stranded serves as a  
template for the Klenow fragment of polymerase I of *E.*  
*coli* (under the standard conditions recommended by the  
manufacturer (New England Biolabs)) for the creation of  
10 the double-stranded oligonucleotide starting from the 3'  
end of each oligo. This double-stranded oligonucleotide  
containing the coding part of thanatin (SEQ ID NO 1) is  
then directly cloned into the plasmid pRPA-MD-P which  
has been digested with the restriction enzyme *NaeI*. The  
15 correct orientation of the clone obtained is checked by  
sequencing. A clone is then obtained comprising the  
region encoding the fusion protein PR-1a-thanatin  
situated between the *NcoI* restriction sites at the N-  
terminal end and the *ScaI*, *SacII* and *BamHI* restriction  
20 sites at the C-terminal end (SEQ ID NO 4).

pRPA-RD-229: Creation of an expression vector in plants comprising the sequence encoding the fusion protein PR-1a-thanatin

25           The plasmid pRTL-2 GUS, derived from the  
plasmid pUC-19, was obtained from Dr Jim Carrington  
(Texas A&M University, not described). This plamid,  
whose schematic structure is represented in Figure 1,

contains the double CaMV 35S promoter isolated from the cauliflower mosaic virus (CaMV 2x35S promoter, Odell et al., 1985) which directs the expression of an RNA containing [lacuna] tobacco etch virus 5' untranslated  
 5 sequence (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), the *E.coli*  $\beta$ -glucorinidase gene (GUS; Jefferson et al., 1987) followed by the polyadenylation site of the CaMV 35S RNA (CaMV polyA; Odell et al., 1985).

The plasmid pRTL-2 GUS is digested with the  
 10 restriction enzymes *NcoI* and *BamHI*, and the large DNA fragment is purified. The plasmid pRPA-PS-PR1a-than is digested with the restriction enzymes *NcoI* and *BamHI*, and the small DNA fragment containing the region encoding the fusion protein PR-1a-thanatin is purified.  
 15 The two DNA fragments purified are then ligated together in an expression cassette in plants which synthesizes a PR-1a-thanatin fusion protein. The schematic structure of this expression cassette is represented in Figure 2. "PR-1a-thanatin" represents  
 20 the coding region for the fusion protein PR-1a-thanatin of pRPA-RD-230. The thanatin is transported to the extracellular matrix of the plant by the action of the signal peptide PR-1a.

25 **pRPA-RD-195: Creation of a plasmid containing a modified multiple cloning site**

The plasmid pRPA-RD-195 is a plasmid derived from pUC-19 which contains a modified multiple cloning

site. The complementary synthetic oligonucleotides Oligo 5 and Oligo 6 below are hybridized and made double-stranded according to the procedure described for pRPA-MD-P.

5

Oligo 5:     5'     AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC  
                           GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG  
                           CATGC 3'

10 Oligo 6:     5'     CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT  
                           GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 3'

The double-stranded oligonucleotide obtained is then ligated into pUC-19 which has been previously  
 15 digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *HindIII* and made blunt ended using the Klenow fragment of DNA polymerase I of *E. coli*. A vector is obtained containing multiple cloning sites in order to facilitate the introduction of expression cassettes  
 20 into an *Agrobacterium tumefaciens* vector plasmid. The schematic structure of this multiple cloning site is represented in Figure 3.

#### **pRPA-RD-232: Introduction of the PR-1a-thanatin**

25 **expression cassette of pRPA-RD-229 into pRPA-RD-195**

The plasmid pRPA-RD-230 is digested with the restriction enzyme *HindIII*. The DNA fragment containing the PR-1a-thanatin expression cassette is purified. The

purified fragment is then ligated into pRPA-RP-195 which has previously been digested with the restriction enzyme *HindIII* and dephosphorylated with calf intestinal phosphatase.

5

**pRPA-RD-174: Plasmid derived from pRPA-BL-150A (EP 0,508,909) containing the bromoxynil tolerance gene of pRPA-BL-237 (EP 0,508,909)**

The bromoxynil tolerance gene is isolated from pRPA-BL-237 by a PCR gene amplification. The fragment obtained is blunt-ended and is cloned into the *EcoRI* site of pRPA-BL-150A which has been made blunt-ended by the action of Klenow polymerase under standard conditions. An *Agrobacterium tumefaciens* vector is obtained which contains the bromoxynil tolerance gene close to its right border, a kanamycin tolerance gene close to its left border and a multiple cloning site between these two genes.

The schematic structure of pRPA-RD-174 is represented in Figure 4. In this figure, "nos" represents the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase polyadenylation site (Bevan et al., 1983), "NOS pro" represents the *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase promoter (Bevan et al., 1983), "NPT II" represents the neomycin phosphotransferase gene of the *E. coli* Tn5 transposon (Rothstein et al., 1981), "35S pro" represents the 35S promoter isolated from the cauliflower mosaic virus (Odell et al., 1985), "BRX"

represents the nitrilase gene isolated from *K. ozaenae* (Stalker et al., 1988), and "RB" and "LB" represent respectively the right and left borders of the sequence of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid.

5

pRPA-RD-184: Addition of a new unique restriction site  
into pRPA-RD-174

The complementary synthetic oligonucleotides Oligo 7 and Oligo 8 below are hybridized and made double-stranded according to the procedure described for pRPA-MD-P.

Oligo 7: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC  
 CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG  
 15 TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 8: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA  
CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT  
GTGGCCTGAC TGG 3'

20

The double-stranded oligonucleotide hybridized (95 base pairs) is purified after separation on agarose gel (3% Nusieve, FMC). The plasmid pRPA-RD-174 is digested with the restriction enzyme *XmaI*, and the large DNA fragment is purified. The two DNA fragments obtained are then ligated.

A plasmid derived from pRPA-RD-174 is obtained comprising other restriction sites between the

bromoxynil tolerance gene and the selectable marker kanamycin gene.

The schematic structure of the plasmid pRPA-RD-184 is represented in Figure 5 where the terms  
 5 "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" and "LB" have the same meaning as in Figure 4.

**pRPA-RD-235: Creation of an *Agrobacterium tumefaciens* vector containing the gene construct encoding thanatin**  
 10 **directed towards the extracellular matrix**

The plasmid pRPA-RD-232 is digested with the restriction enzymes *PmeI* and *AscI*, and the DNA fragment containing the gene for PR-1a-thanatin is purified. The plasmid pRPA-RD-184 is digested with the same  
 15 restriction enzymes. The DNA fragment containing the PR-1a-thanatin expression cassette is then ligated into pRPA-RD-184. An *Agrobacterium tumefaciens* vector is thus obtained containing the sequence encoding the fusion protein PR-1a-thanatin which leads to the  
 20 expression of thanatin in the plant's extracellular matrix.

**Example 2: Herbicide tolerance of transformed tobaccos**

**2.1 - Transformation**

25 The vector pRPA-RD-235 is introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain (Hood et al., 1987) carrying the cosmid pTVK291 (Komari et al.,



1986). The transformation technique is based on the procedure of Horsch et al. (1985).

## **2.2 - Regeneration**

The regeneration of the tobacco PBD6 (origin SEITA France) from foliar explants is carried out on a Murashige and Skoog (MS) basal medium comprising 30 g/l of sucrose as well as 200 µg/ml of kanamycin. The foliar explants are removed from plants cultivated in a greenhouse or *in vitro* and regenerated according to the foliar disc technique (Horsch et al., 1985) in three successive stages: the first comprises the induction of shoots on a medium supplemented with 30 g/l of sucrose containing 0.05 mg/l of naphthylacetic acid (NAA) and 2 mg/l of benzylaminopurine (BAP) for 15 days. The shoots formed during this stage are then developed for 10 days by cultivating on an MS medium supplemented with 30 g/l of sucrose but containing no hormones. Next, the developed shoots are removed and they are cultivated on an MS rooting medium with half the content of salts, vitamins and sugar and containing no hormone. After about 15 days, the rooted shoots are transferred into the soil.

## **2.3 - Bromoxynil tolerance**

Twenty transformed plants were regenerated and transferred into a greenhouse for the pRPA-RD-235 construct. These plants were then treated in a greenhouse at the 5-leaf stage with an aqueous

suspension of Pardner corresponding to 0.2 kg of bromoxynil active material per hectare.

All the plants showing complete tolerance to bromoxynil are then used in various experiments which  
 5 show that the expression of thanatin by the transformed plants makes them resistant to fungal attacks.

### REFERENCES

- F.A. Ausubel et al. (Ed. Greene). Current Protocols in  
 10 Molecular Biology. Publ. Wiley & Sons.
- M. Bevan et al. (1983). Nuc. Acids Res. **11**: 369-385.
- Carrington and Freed (1990). J. Virol. **64**: 1590-1597.
- Ehret-Sabatier et al. (1996). The Journal of Biological Chemistry, **271**, **47**, 29537-29544.
- 15 Horsch et al. (1985). Science **227**: 1229-1231.
- Jefferson et al. (1987). EMBO J. **6**: 3901-3907.
- Komari et al. (1986). J. Bacteriol. **166**: 88-94.
- Rothstein et al. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **45**: 99-105.
- 20 Stalker et al. (1988). J. Biol. Chem. **263**: 6310-6314.
- J.T. Odell et al. (1985). Nature **313**: 810-812.

CLAIMS

1. Nucleic acid fragment, characterized in that it comprises a nucleic acid sequence encoding  
5 thanatin.
2. Nucleic acid fragment according to claim 1, characterized in that it is a DNA-type nucleotide sequence.
3. Nucleic acid fragment according to claim  
10 2, characterized in that the DNA-type nucleotide sequence comprises the DNA sequence described by the sequence identifier No. 1 (SEQ ID NO 1), a homologous sequence or a sequence complementary to the said sequence.
- 15 4. Nucleic acid fragment according to claim 3, characterized in that the DNA-type nucleotide sequence comprises the DNA sequence described by the sequence identifier No. 2 (SEQ ID NO 2), a homologous sequence or a sequence complementary to the said  
20 sequence.
5. Nucleic acid fragment according to one of claims 1 to 4, characterized in that it comprises a nucleic acid sequence fused in 5' and/or in 3' to the sequence encoding thanatin, so as to obtain a "protein-  
25 thanatin" fusion protein.

6. Nucleic acid fragment according to claim 5, characterized in that the protein is a signal peptide or a transit peptide.

7. Nucleic acid fragment according to claim 5 6, characterized in that the signal peptide is the signal peptide of the tobacco PR-1a gene.

8. Nucleic acid fragment according to claim 7, characterized in that it comprises the DNA sequence described by the sequence identifier No. 5 (SEQ ID NO 5), a homologous sequence or a sequence complementary to the said sequence.

9. Nucleic acid fragment according to claim 8, characterized in that it comprises the coding part of SEQ ID NO 5, corresponding to bases 12 to 164.

10. Fusion protein "protein-thanatin", characterized in that the protein is a signal peptide or a transit peptide.

11. Fusion protein according to claim 10, characterized in that the signal peptide is the signal peptide of the tobacco PR-1a gene.

12. Fusion protein according to claim 11, characterized in that it is described by the sequence identifier No. 5 (SEQ ID NO 5).

13. Chimeric gene comprising a coding sequence as well as heterologous regulatory elements at the 5' and 3' positions which can function in a host organism, in particular plants, characterized in that

the coding sequence comprises at least one DNA fragment encoding thanatin as defined in claims 1 to 9.

14. Chimeric gene according to claim 13, characterized in that the host organism is chosen from  
5 plant cells and plants.

15. Chimeric gene according to either of claims 13 and 14, characterized in that it also comprises a selectable marker.

16. Cloning or expression vector for the  
10 transformation of a host organism, characterized in that it comprises at least one replication origin and at least one chimeric gene as defined in claims 13 to 15.

17. Vector according to claim 16,  
15 characterized in that it is a virus used for the transformation of developed plants and containing, in addition, its own elements for replication and expression.

18. Vector according to claim 16,  
20 characterized in that it is a plasmid.

19. Transformed host organisms, characterized in that they contain an effective quantity of a chimeric gene according to claims 13 to 15.

20. Transformed host organism according to claim 19, characterized in that it consists of plant cells or plants.

21. Transformed host organism according to claim 20, characterized in that it is a plant containing transformed cells.

22. Host organism according to claim 21,  
5 characterized in that the plant is regenerated from transformed cells.

23. Transformed plant cell, characterized in that it contains a nucleic acid fragment according to claims 1 to 9, or a chimeric gene according to claims  
10 13 to 15.

24. Transformed plant resistant to diseases, characterized in that it comprises at least one transformed plant cell according to claim 23.

25. Transformed plant according to claim 24,  
15 characterized in that it is resistant to diseases caused by *Cercospora*, in particular *Cercospora beticola*, *Cladosporium*, in particular *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, in particular *Fusarium culmorum* or *Fusarium graminearum* or by *Phytophthora*, in particular  
20 *Phytophthora cinnamomi*.

26. Disease-resistant transformed plant, characterized in that it is derived from the cultivation and/or crossing of plants according to either of claims 24 and 25.

25 27. Seeds of transformed plants according to one of claims 24 to 26.

28. Method of transforming host organisms, in particular plant cells or plants, characterized in

that at least one nucleic acid fragment according to claims 1 to 9 or a chimeric gene according to one of claims 13 to 15 is inserted into the said host organism.

5                   29. Method of transforming plants to make them resistant to fungal or bacterial diseases, characterized in that at least one nucleic acid fragment according to claims 1 to 9 or a chimeric gene according to claims 13 to 15 is inserted into the  
10 plant.

                  30. Method according to either of claims 28 and 29, characterized in that the chimeric gene is inserted by means of a vector according to one of claims 16 to 18.

## SEQUENCE LISTING

## (1) GENERAL INFORMATION:

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 13

## 5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 33 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

10 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION:1..33

## 15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT AAG TGC

33

Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys

1

5

10

## 20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 63 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

25 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS



(B) LOCATION:1..63

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT 48

Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly

5 1 5 10 15

AAG TCG CAG AGG ATG

Lys Cys Gln Arg Met

20

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 98 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

15 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION:1..63

20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT 48

Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly

1 5 10 15

25 AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCCGG 98

Lys Cys Gln Arg Met

20

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 106 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

5 (C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

10 (B) LOCATION:12..101

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT 50

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu

1

5

10

15 CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT 98

Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg

15

20

25

GCC GCGCA

106

Ala

30

## 5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 197 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

10 (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION:12..164

## 15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT 50

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu

1 5 10

CTT GTG TCT AT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT 98

20 Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg

15 20 25

GCC GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT 146

Ala Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr

30 35 40 45

25 GGT AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCC 197

Gly Lys Cys Gln Arg Met

50

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 75 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 1"

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

10 GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA 60  
CTCTTCTTCT TTTCC

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

15 (A) LENGTH: 72 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

20 (A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 2"

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60  
AAAGATGGAA GC 72

## 25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 44 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 3"

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

GGTTCCAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA CG

42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10 (A) LENGTH: 97 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

15 (A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 4"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GTCACATCC TCTGGCACTT ACCAGTCCTC 60

CTGTTGCAGT AGATGATTGG CACTGGC 87

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 85 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 5"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC 60  
CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC 85

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 110:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 66 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

10 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 6"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC TAGAGG 60

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

20 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 7"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

25 CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60  
GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG 93

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 93 base pairs

(B) TYPE: nucleotide

(C) STRANDEDNESS: single

5 (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: Other nucleic acid

(A) DESCRIPTION:/desc = "synthetic oligonucleotide 8"

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

10	CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC	60
	GCGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG	93

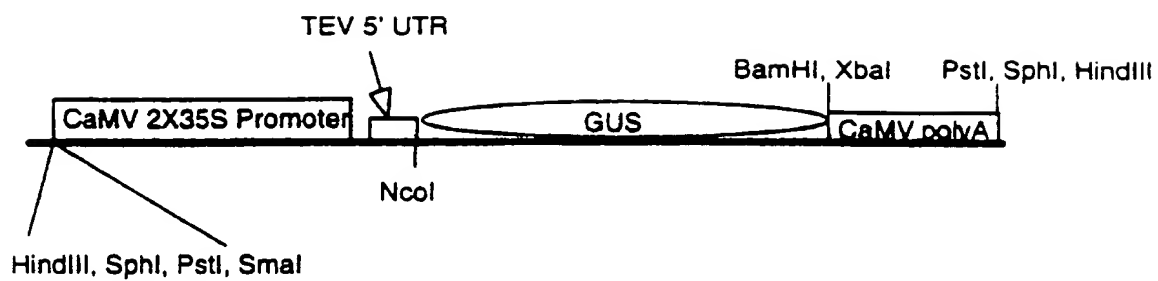


Fig. 1

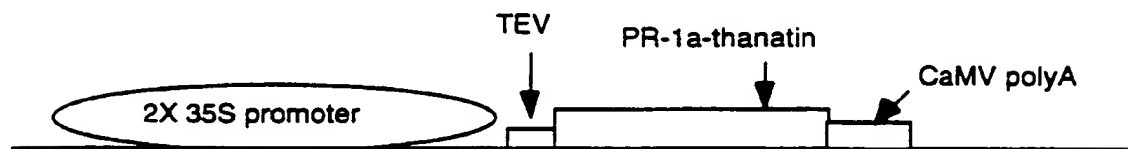


Fig. 2

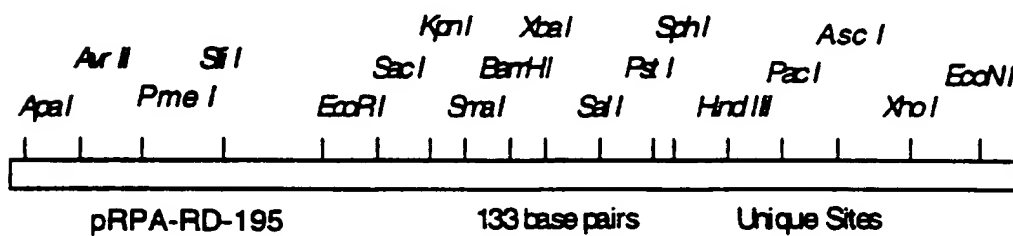
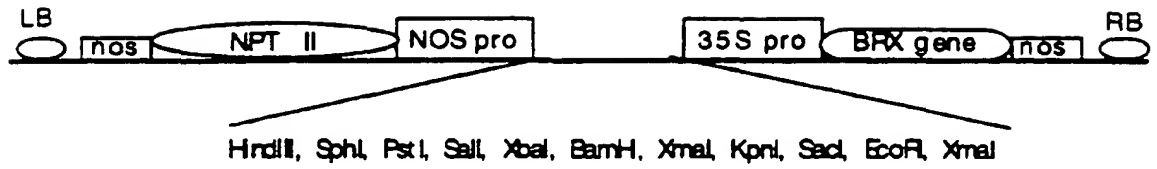
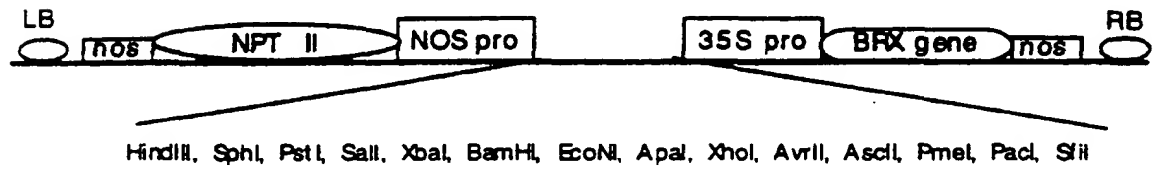


Fig. 3





**Fig. 4**



**Fig. 5**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02375

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/62 C12Q1/68 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K C12Q A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	FR 2 733 237 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 25 October 1996 cited in the application page 4, ligne 20-21; page 8, ligne 16 - page 9, ligne 11; revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM, P., ET AL.: "structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, February 1996, pages 1221-1225, XP002071913 see the whole document --- -/--	1-30

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 1999

Date of mailing of the international search report

25/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Holtorf, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No  
PCT/FR 98/02375

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	FR 2 732 345 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 4 October 1996 see page 5, line 15 - line 21 ---	1-30
A	EP 0 798 381 A (NAT INST AGROBIO RES) 1 October 1997 page 6, ligne 8-20; examples, revendications ---	1-30
A	WO 90 14098 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 29 November 1990 page 3, page 6, ligne 5 -18; page 6, ligne 34 - page 7, ligne9; examples, revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM P ET AL: "INSECT IMMUNITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 52, 30 December 1994, pages 33159-33163, XP002061373 see the whole document -----	1-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02375

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2733237	A	25-10-1996	NONE	
FR 2732345	A	04-10-1996	NONE	
EP 0798381	A	01-10-1997	JP 9252779 A	30-09-1997
			JP 10028487 A	03-02-1998
			CA 2198920 A	26-09-1997
WO 9014098	A	29-11-1990	AU 5662990 A	18-12-1990

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. le internationale No

PCT/FR 98/02375

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/62 C12Q1/68 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K C12Q A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 733 237 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 25 octobre 1996 cité dans la demande page 4, ligne 20-21; page 8, ligne 16 - page 9, ligne 11; revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM, P., ET AL.: "structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, février 1996, pages 1221-1225, XP002071913 voir le document en entier --- -/--	1-30

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites. avec le cas echeant. l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
A	FR 2 732 345 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 4 octobre 1996 voir page 5, ligne 15 - ligne 21 ---	1-30
A	EP 0 798 381 A (NAT INST AGROBIO RES) 1 octobre 1997 page 6, ligne 8-20; exemples, revendications ---	1-30
A	WO 90 14098 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 29 novembre 1990 page 3, page 6, ligne 5 -18; page 6, ligne 34 - page 7, ligne9; exemples, revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM P ET AL: "INSECT IMMUNITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 52, 30 decembre 1994, pages 33159-33163, XP002061373 voir le document en entier -----	1-30

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Der. e internationale No

PCT/FR 98/02375

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2733237	A	25-10-1996	AUCUN	
FR 2732345	A	04-10-1996	AUCUN	
EP 0798381	A	01-10-1997	JP 9252779 A	30-09-1997
			JP 10028487 A	03-02-1998
			CA 2198920 A	26-09-1997
WO 9014098	A	29-11-1990	AU 5662990 A	18-12-1990







## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, C07K 14/435, C12N 15/62,</b> <b>C12Q 1/68, A01H 5/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/24594</b>  <b>(43) Date de publication internationale: 20 mai 1999 (20.05.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/02375 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 6 novembre 1998 (06.11.98) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/14263 7 novembre 1997 (07.11.97) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC AGRO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, F-69009 Lyon (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> FREYSSINET, Georges [FR/FR]; 21, rue de Nervieux, F-69450 Saint Cyr au Mont d'Or (FR). DEROSE, Richard [US/FR]; 31, rue du Bois Guillaume, F-91000 Evry (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). <b>(74) Mandataire:</b> TETAZ, Franck; Rhône-Poulenc Agro - DPI, Boîte postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> GENE CODING FOR THANATIN, VECTOR CONTAINING SAME AND RESULTING TRANSFORMED DISEASE-RESISTANT PLANTS		
<b>(54) Titre:</b> GENE CODANT POUR LA THANATINE, VECTEUR LE CONTENANT ET PLANTES TRANSFORMÉES OBTENUES RESISTANTES AUX MALADIES		
<b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a DNA sequence coding for thanatin, a vector containing it for transforming a host organism and the transformation method. More particularly the invention concerns the transformation of plant cells and plants, the drosomycin produced by the plants providing them with resistance to diseases, particularly of fungal origin.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la thanatine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation. L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la drosomycine produite par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.</p>		

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Gène codant pour la thanatine, vecteur le contenant et plantes transformées obtenues résistantes aux maladies

5 La présente invention a pour objet une séquence d'ADN codant pour la thanatine, un vecteur la contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des cellules végétales et des plantes, la thanatine produite par les plantes transformées leur conférant une  
10 résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

Il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à  
15 transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

On connaît différentes substances d'origine naturelle, en particulier des peptides, présentant des propriétés bactéricides ou fongicides, notamment contre les champignons responsables des maladies des plantes. Toutefois, le problème consiste à trouver de telles  
20 substances qui pourront non seulement être produites par des plantes transformées, mais encore conserver leurs propriétés bactéricides ou fongicides et les conférer aux dites plantes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

25 La thanatine est un peptide produit par induction bactérienne sur *Psodius sp.* de préférence *maculiventris* adultes. Sa préparation par induction bactérienne est décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, de même que ses propriétés antifongiques et antibactériennes *in vitro*.

Après avoir d'abord identifié le gène de la thanatine, on a également trouvé qu'il  
30 pouvait être inséré dans un organisme hôte, en particulier une plante, pour exprimer la thanatine et conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques et aux maladies d'origine bactérienne, apportant une solution particulièrement avantageuse au problème énoncé ci-dessus.

L'invention a donc d'abord pour objet un fragment d'acide nucléique codant pour la  
35 thanatine, un gène chimère comprenant ledit fragment codant pour la thanatine ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier dans les plantes et un vecteur pour la transformation des organismes hôtes contenant ce gène chimère, et l'organisme hôte transformé. Elle concerne aussi une cellule végétale transformée contenant au moins un fragment d'acide

nucléique codant pour la thanatine et une plante résistante aux maladies contenant la dite cellule, en particulier régénérée à partir de cette cellule. Elle concerne enfin un procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies dans lequel on insère un gène codant pour la thanatine au moyen d'un vecteur approprié.

5 Par thanatine, on entend selon l'invention tout peptide comprenant essentiellement la séquence peptidique de 11 acides aminés décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, ainsi que les séquences homologues équivalentes dans lesquelles certains acides aminés sont remplacés par des acides aminés différents mais équivalents sur des sites n'induisant pas de modification substantielle de l'activité antifongique ou antibactérienne  
10 de la dite séquence homologue. Par séquence peptidique comprenant essentiellement la séquence peptidique décrite dans la demande de brevet FR 2 733 237, on entend non seulement la séquence définie par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), mais également une telle séquence comprenant à l'une ou l'autre de ses extrémités, ou les deux, des résidus peptidiques nécessaires à son expression et ciblage dans un organisme hôte, en  
15 particulier une cellule végétale ou une plante.

La thanatine est un peptide de formule (I):



(I)

dans laquelle:

20 Xaa est NH<sub>2</sub> ou un reste variable de séquence comprenant de 1 à 10 acides aminés, et

Xab est OH ou un reste variable de séquence comprenant de 0 à 5 acides aminés.

De manière avantageuse, lorsque Xaa comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe  
25 comprenant Gly, Ser, Lys, Pro et Val. Lorsque Xab comprend au moins un acide aminé, celui-ci est l'un des 20 acides aminés de base et plus particulièrement choisi dans le groupe comprenant Gln, Arg et Met.

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les 2 résidus cystéines du peptide de formule (I) forment un pont disulfure intramoléculaire.

30 La présente invention concerne donc d'abord un fragment d'acide nucléique, en particulier d'ADN, codant pour la thanatine définie ci-dessus. Il peut s'agir selon l'invention d'un fragment isolé de *Psodius sp.*, de préférence *maculiventris*, ou encore un fragment dérivé, adapté pour l'expression de la thanatine dans l'organisme hôte où le peptide sera exprimé. le fragment d'acide nucléique peut être obtenu selon les méthodes  
35 standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel & coll.

Selon la présente invention, on entend par « fragment d'acide nucléique » une séquence nucléotidique pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN.

en particulier ADNc, notamment double brin.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le fragment d'acide nucléique codant pour la thanatine comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

De manière avantageuse, le fragment d'acide nucléique selon l'invention comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.

Par « homologue », on entend selon l'invention un fragment d'acide nucléique présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence nucléotidique décrite par l'identificateur de séquence n° 1 ou n° 2 et codant pour la thanatine. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation, ou encore en choisissant les oligonucléotides synthétiques employés dans la préparation de ladite séquence par hybridation. Au regard des multiples combinaisons d'acides nucléiques pouvant conduire à l'expression d'un même acide aminé, les différences entre la séquence de référence décrite par l'identificateur de séquence n° 1 ou n° 2 et l'homologue peuvent être importantes, d'autant plus qu'il s'agit d'un fragment d'ADN de taille inférieure à 100 acides nucléiques, réalisable par synthèse. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport à la séquence de référence, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Ces modifications sont généralement neutres, c'est à dire qu'elles n'affectent pas la séquence primaire de la thanatine résultante.

La présente invention concerne également un gène chimère (ou cassette d'expression) comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les cellules végétales ou les plantes, la séquence codante comprenant au moins un fragment d'ADN codant pour la thanatine tel que défini ci-dessus.

Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être introduit, pour la production de thanatine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*, ou de préférence des cellules végétales et des plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le

tabac, le coton, etc.

Les éléments de régulation nécessaires à l'expression du fragment d'ADN codant pour la thanatine sont bien connus de l'homme du métier en fonction de l'organisme hôte. Ils comprennent notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides de transit, des séquences terminatrices, y compris des codons start et stop. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner les éléments de régulation sont bien connus de l'homme du métier.

Le fragment d'acide nucléique selon l'invention peut également comprendre une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour la thanatine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-thanatine », dont la coupure par les systèmes enzymatiques de l'organisme hôte permet la libération de la thanatine. Cette protéine fusionnée à la thanatine peut être un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la thanatine de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou « prépeptide », éventuellement en association avec un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou « propeptide ». Le réticulum endoplasmique est le lieu où sont pris en charge par la « machinerie cellulaire » des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

L'invention concerne plus particulièrement la transformation des plantes. Comme séquence de régulation promotrice dans les plantes, on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou d'un gène de virus de plante tel que, par exemple, celui de la mosaïque du choux fleur (CAMV 19S ou 35S), ou un promoteur inducible par les pathogènes comme PR-la du tabac ou AoPRT-L d'asperge, tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante de manière constitutive ou induite par l'attaque d'un pathogène, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par

exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington & Freed, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, constituée d'une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande EP 0 508 909. Comme peptide de transit, on peut citer le peptide signal du gène PR-1a du tabac décrit par Cornelissen & coll., représenté avec sa séquence codante par l'identificateur de séquence n° 3.

La séquence codant pour la protéine de fusion peptide signal PR-1a-thanatine et cette protéine de fusion sont également partie de la présente invention. Cette séquence est notamment décrite par l'identificateur de séquence n° 5, plus particulièrement la partie codante de cette séquence, correspondant aux bases 12 à 164.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également comprendre un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, comme la pénicilline, ou encore un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes.

La présente invention concerne également un vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte contenant au moins un gène chimère tel que défini ci-dessus. Ce vecteur comprend outre le gène chimère ci-dessus, au moins une origine de répllication. Ce vecteur peut être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus, transformés par l'introduction du gène chimère selon l'invention. De tels vecteurs de transformation en fonction de l'organisme hôte à transformer sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes

hôtes, en particulier des cellules végétales par intégration d'au moins un fragment d'acide nucléique ou un gène chimère tels que définis ci-dessus, transformation qui peut être obtenue par tout moyen connu approprié, amplement décrit dans la littérature spécialisée et notamment les références citées dans la présente demande, plus particulièrement par le vecteur selon l'invention.

Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN. Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

D'autres méthodes peuvent être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a encore pour objet les organismes hôtes, en particulier cellules végétales ou plantes, transformés et contenant une quantité efficace d'un gène chimère comprenant une séquence codante pour la thanatine définie ci-dessus.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépende de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

La présente invention concerne également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes. De ce fait, la séquence d'ADN codant pour la thanatine peut être intégrée avec pour objectif principal la réalisation de plantes résistantes aux dites maladies, la thanatine étant efficace contre des maladies fongiques telles que celles causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.



Le gène chimère pourra comprendre également et de manière avantageuse au moins un marqueur de sélection, tel qu'un ou plusieurs gènes de tolérance aux herbicides.

La séquence d'ADN codant pour la thanatine peut également être intégrée comme marqueur de sélection lors de la transformation de plantes avec d'autres séquences codant pour d'autres peptides ou protéines d'intérêt, comme par exemple des gènes de tolérance aux herbicides.

De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre outre la séquence codant pour la thanatine, d'autres séquences hétérologues codant pour d'autres peptides complémentaires susceptibles de conférer à la plante des résistances à d'autres maladies d'origine bactérienne ou fongique.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour la thanatine et au moins une autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour la thanatine, l'autre portant un gène codant pour au moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Parmi les séquences codant pour d'autres peptides antifongiques, on peut citer celle codant pour la drosomycine, décrite dans la demande de brevet FR 2 725 992 et par Fehlbaum & coll. (1994), et dans la demande de brevet non publiée FR 97 09115 déposée le 24 juillet 1997, ou celle codant pour l'androctonine décrite dans la demande de brevet FR 2 745 004 et dans la demande de brevet non publiée FR 97 10362 déposée le 20 août 1997.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, la préparation de la séquence codant pour la thanatine, du gène chimère, du vecteur d'intégration et des plantes transformées. Les figures 1 à 5 en annexe décrivent les structures schématiques de certains plasmides préparés pour la construction des gènes chimères. Dans ces figures, les différents sites de restriction sont marqués en *italiques*.

### **Exemple 1: Construction des gènes chimères**

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standard de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques sont notamment décrits dans Ausubel & coll.

**pRPA-MD-P: Création d'un plasmide contenant le signal peptide du gène PR-1a du tabac.**

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 1 et Oligo 2 ci-après, sont hybridés à 65 °C pendant 5 minutes puis par diminution lente de la température à 30°C pendant 30'.

Oligo 1: 5' GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC  
ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA CTCTTCTTCT TTTCC 3'

Oligo 2: 5' TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA  
GAAGAGTAGA CACAAGAAGG AAAGATGGAA GC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 1 et l'Oligo 2, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *SacII* et *NaeI* et cloné dans le plasmide pBS II SK(-) (Stratagene) digéré par les mêmes enzymes de restriction. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour peptide signal du gène PR-1a du tabac (SEQ ID NO 3).

**pRPA-PS-PR1a-than: Création d'une séquence codant pour la thanatine fusionnée au signal peptide PR-1a sans région non transcrite en 3'.**

Les deux oligonucléotides synthétiques complémentaires de séquences Oligo 3 et Oligo 4 selon les conditions opératoires décrites pour pRPA-MD-P.

Oligo 3: 5' GGTTCOAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA  
CG 3'

Oligo 4: 5' CCGGATCCGT CGACACGTTC GCCTCGCCGA GCTCACATCC  
TCTGGCACTT ACCAGTCCTC CTGTTGCAGT AGATGATTGG  
CACTGGC 3'

Après hybridation entre l'Oligo 3 et l'Oligo 4, l'ADN resté simple brin sert de matrice au fragment klenow de la polymérase 1 de *E. coli* (dans les conditions standard préconisées par le fabriquant (New England Biolabs)) pour la création de l'oligonucléotide double brin à partir de l'extrémité 3' de chaque oligo. Cet oligonucléotide double brin contenant la partie codante de la thanatine (SEQ ID NO 1) est ensuite cloné directement

dans le plasmide pRPA-MD-P qui a été digéré avec l'enzyme de restriction *NaeI*. L'orientation correcte du clone obtenu est vérifiée par séquençage. On obtient alors un clone comprenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-*th*anatine située entre les sites de restriction *NcoI* à l'extrémité N-terminale et *ScaI*, *SacII* et *BamHI* à l'extrémité C-terminale (SEQ ID NO 4).

**pRPA-RD-229: Création d'un vecteur d'expression dans les plantes comprenant la la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine.**

Le plasmide pRTL-2 GUS, dérivé du plasmide pUC-19, a été obtenu auprès du Dr. Jim Carrington (Texas A&M University, non décrit). Ce plasmide dont la structure schématique est représentée sur la figure 1, contient le promoteur CaMV 35S dupliqué isolé du virus de la mosaïque du chou fleur (Promoteur CaMV 2x35S; Odell & coll., 1985) qui dirige l'expression d'un ARN contenant séquence non traduite en 5' du virus et du tabac (TEV 5' UTR; Carrington & Freed, 1990), le gène de la  $\beta$ -glucuronidase de *E. coli* (GUS Jefferson & coll., 1987) suivi du site de polyadenylation de l'ARN 35S de CaMV (CaMV polyA; Odell & coll., 1985).

Le plasmide pRTL-2 GUS est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le grand fragment d'ADN est purifié. Le plasmide pRPA-PS-PR1a-*thn* est digéré avec les enzymes de restriction *NcoI* et *BamHI* et le petit fragment d'ADN contenant la région codant pour la protéine de fusion PR-1a-*thn* est purifié. Les deux fragments d'ADN purifiés sont ensuite liés ensemble dans une cassette d'expression dans les plantes qui synthétise une protéine de fusion PR-1a-*thn*. La structure schématique de cette cassette d'expression est représentée sur la figure 2. « PR-1a-*thn* » représente la région codante pour la protéine de fusion PR-1a-*thn* de pRPA-RD-230. La *thn* est transportée vers la matrice extra-cellulaire de la plante par l'action du peptide signal PR-1a.

**pRPA-RD-195: Création d'un plasmide contenant un site de clonage multiple modifié.**

30 Le plasmide pRPA-RD-195 est un plasmide dérivé du pUC-19 qui contient un site de clonage multiple modifié. Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 5 et Oligo 6 ci-après, sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

35    Oligo 5:        5'    AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC  
                         GAGCTCGGTA CCCGGGGATC CTCTAGAGTC GACCTGCAGG  
                         CATGC    3'

Oligo 6: 5' CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT  
GCATGCCTGC AGGTGCTACTC TAGAGG 3'

L'oligonucléotide double brin obtenu est ensuite lié dans pUC-19 qui a été  
5 préalablement digéré avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *HindIII* et rendu bouts  
francs en employant le fragment klenow de l'ADN polymérase 1 de *E. coli*. On obtient un  
vecteur contenant de multiples sites de clonage pour faciliter l'introduction des cassettes  
d'expression dans un plasmide vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*. La structure  
schématique de ce site de clonage multiple est représentée sur la figure 3.

10

**pRPA-RD-232: Introduction de la cassette d'expression de PR-1a-thanatine de  
pRPA-RD-229 dans pRPA-RD-195.**

Le plasmide pRPA-RD-230 est digéré avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Le  
fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-thanatine est purifié. Le  
15 fragment purifié est ensuite lié dans pRPA-RP-195 qui a été préalablement digéré avec  
l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé avec la phosphatase intestinale de veau.

**pRPA-RD-174: Plasmide dérivé de pRPA-BL-150A (EP 0 508 909) contenant le gène  
de tolérance au bromoxynil de pRPA-BL-237 (EP 0 508 909).**

20 Le gène de tolérance au bromoxynil est isolé de pRPA-BL-237 par une  
amplification génique par PCR. Le fragment obtenu est à bouts francs et est cloné dans le  
site *EcoRI* de pRPA-BL-150A qui a été rendu bouts francs par l'action de la polymérase  
klenow dans des conditions standard. On obtient un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens*  
qui contient le gène de tolérance au bromoxynil à proximité de sa bordure droite, un gène  
25 de tolérance à la kanamycine à proximité de sa bordure gauche et un site de clonage  
multiple entre ces deux gènes.

La structure schématique de pRPA-RD-174 est représentée sur la figure 4. Sur  
cette figure, "nos" représente le site de polyadénylation de la nopaline synthase  
d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983), "NOS pro" représente le promoteur  
30 de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan & coll., 1983). "NPT II"  
représente le gène de la néomycine phosphotransférase du transposon Tn5 de *E. coli*  
(Rothstein & coll., 1981), "35S pro" représente le promoteur 35S isolé du virus de la  
mosaïque du chou fleur (Odell & coll., 1985), "BRX" représente le gène de la nitrilase  
isolé de *K. ozaenae* (Stalker & coll., 1988), "RB" et "LB" représentent respectivement les  
35 bordures droite et gauche de la séquence d'un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

**pRPA-RD-184: Addition d'un nouveau site de restriction, unique, dans pRPA-RD-  
174.**

Les oligonucléotides synthétiques complémentaires Oligo 7 et Oligo 8 ci-après,

sont hybridés et rendus double brin selon la procédure décrite pour pRPA-MD-P.

Oligo 7: 5' CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC  
 CCGGCGCGC CTAGGTGTGT GCTCGAGGGC CCAACCTCAG  
 5 TACCTGGTTC AGG 3'

Oligo 8: 5' CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA  
 CACCTAGGCG CGCCGGGGCC GCGTTTAAAC TTAATTAAGT  
 GTGGCCTGAC TGG 3'

L'oligonucléotide double brin hybridé (95 paires de bases) est purifié après séparation sur un gel d'agarose (3 % Nusieve, FMC). Le plasmide pRPA-RD-174 est digéré avec l'enzyme de restriction *XmaI*, et le grand fragment d'ADN est purifié. Les deux fragments d'ADN obtenus sont ensuite liés.

On obtient un plasmide dérivé de pRPA-RD-174 comprenant d'autres sites de restriction entre le gène de tolérance au bromoxynil et le gène de la kanamycine marqueur de sélection.

La structure schématique du plasmide pRPA-RD-184 est représentée sur la figure 5 où les termes "nos", "NPT II", "NOS pro", "35S pro", "BRX gene", "RB" et "LB" ont la même signification que pour la figure 4.

#### **pRPA-RD-235: Création d'un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction du gène codant pour la thanatine dirigée vers la matrice extracellulaire.**

La plasmide pRPA-RD-232 est digéré avec les enzymes de restriction *PmeI* et *AscI* et le fragment d'ADN contenant le gène de PR-1a-thanatine est purifié. Le plasmide pRPA-RD-184 est digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le fragment d'ADN contenant la cassette d'expression de PR-1a-thanatine est ensuite liée dans pRPA-RD-184. On obtient ainsi un vecteur d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la séquence codant pour la protéine de fusion PR-1a-thanatine qui conduit à l'expression de la thanatine dans la matrice extracellulaire de la plante.

### **Exemple 2: Tolérance aux herbicides des tabacs transformés.**

#### **2.1- Transformation**

Le vecteur pRPA-RD-235 est introduit dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood & coll., 1987) porteuse du cosmide pTVK291 (Komari & coll., 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh & coll. (1985).

#### **2.2- Régénération**

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants

foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30 g/l de saccharose ainsi que 200 µg/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes cultivées en serre ou *in vitro* et régénérées selon la technique des disques foliaires (Horsh & coll., 1985) en trois étapes successives: la première comprend  
5 l'induction des pousses sur un milieu additionné de 30 g/l de saccharose contenant 0.05 mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées pendant 10 jours par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu  
10 d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucre et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

### **2.3- Tolérance au bromoxynil**

Vingt plantes transformées ont été régénérées et passées en serre pour la construction pRPA-RD-235. Ces plantes ont été traitées en serre au stade 5 feuilles avec  
15 une suspension aqueuse de Pardner correspondant à 0,2 kg de matière active bromoxynil par hectare.

Toutes les plantes montrant une tolérance complète au bromoxynil sont ensuite employées dans différentes expérimentations qui montrent que l'expression de la thanatine  
20 par les plantes transformées les rend résistantes aux agressions fongiques.

### **REFERENCES**

- Ausubel, F. A. & coll. (eds. Greene). Current Protocols in Molecular Biology. Publ. Wiley  
25 & Sons.  
Bevan, M. & coll. (1983). Nuc. Acids Res. **11**:369-385.  
Carrington and Freed (1990). J. Virol. **64**:1590-1597.  
Ehret-Sabatier & coll. (1996) The Journal of Biological Chemistry, **271**, **47**, 29537-29544.  
Horsch & coll. (1985). Science **227**:1229-1231.  
30 Jefferson & coll. (1987). EMBO J. **6**:3901-3907.  
Komari & coll. (1986). J. Bacteriol. **166**:88-94.  
Rothstein & coll. (1981). Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **45**: 99-105.  
Stalker & coll. (1988). J. Biol. Chem. **263**:6310-6314.  
Odell, J.T. & coll. (1985). Nature **313**:810-812.

## REVENDICATIONS

1. Fragment d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique codant pour la thanatine.
- 5 2. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une séquence nucléotidique de type ADN.
3. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 2, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 1 (SEQ ID NO 1), une séquence homologue ou une  
10 séquence complémentaire de ladite séquence.
4. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 3, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique de type ADN comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 2 (SEQ ID NO 2), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.
- 15 5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique fusionnée en 5' et/ou en 3' à la séquence codant pour la thanatine, de manière à obtenir une protéine de fusion « protéine-thanatine ».
6. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce que  
20 la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.
7. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 6, caractérisé en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.
8. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'ADN décrite par l'identificateur de séquence n° 5 (SEQ ID NO  
25 5), une séquence homologue ou une séquence complémentaire de ladite séquence.
9. Fragment d'acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend la partie codante de la SEQ ID NO 5, correspondant aux bases 12 à 164.
10. Protéine de fusion « protéine-thanatine », caractérisée en ce que la protéine est un peptide signal ou un peptide de transit.
- 30 11. Protéine de fusion selon la revendication 10, caractérisée en ce que le peptide signal est le peptide signal du gène PR-1a du tabac.
12. Protéine de fusion selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est décrite par l'identificateur de séquence n° 5 (SEQ ID NO 5).
13. Gène chimère comprenant une séquence codante ainsi que des éléments de  
35 régulation en position 5' et 3' hétérologues pouvant fonctionner dans un organisme hôte, en particulier les plantes, caractérisé en ce que la séquence codante comprend au moins un fragment d'ADN codant pour la thanatine tel que défini dans les revendications 1 à 9.
14. Gène chimère selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'organisme hôte est choisi parmi les cellules végétales et les plantes.

15. Gène chimère selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce qu'il comprend également un marqueur de sélection.
16. Vecteur de clonage ou d'expression pour la transformation d'un organisme hôte caractérisé en ce qu'il comprend au moins une origine de répllication et au moins un
- 5 gène chimère tel que défini dans les revendications 13 à 15.
17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus employé pour la transformation des plantes développées et contenant en outre ses propres éléments de répllication et d'expression.
18. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
- 10 plasmide.
19. Organismes hôtes transformés, caractérisés en ce qu'ils contiennent une quantité efficace d'un gène chimère selon les revendications 13 à 15.
20. Organisme hôte transformé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il s'agit de cellules végétales ou de plantes.
- 15 21. Organisme hôte transformé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une plante contenant des cellules transformées.
22. Organisme hôte selon la revendication 21, caractérisé en ce que la plante est régénérée à partir des cellules transformées.
23. Cellule végétale transformée, caractérisée en ce qu'elle contient un
- 20 fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.
24. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une cellule végétale transformée selon la revendication 23.
25. Plante transformée selon la revendication 24, caractérisée en ce qu'elle est résistante aux maladies causées par *Cercospora*, en particulier *Cercospora beticola*, *Cladosporium* en particulier *Cladosporium herbarum*, *Fusarium*, en particulier *Fusarium culmorum* ou *Fusarium graminearum*, ou par *Phytophthora*, en particulier *Phytophthora cinnamomi*.
26. Plante transformée résistante aux maladies, caractérisée en ce qu'elle est
- 30 issue de la culture et/ou du croisement des plantes selon l'une des revendications 24 ou 25.
27. Graines de plantes transformées selon l'une des revendications 24 à 26.
28. Procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales ou des plantes, caractérisé en ce que l'on insère dans ledit organisme hôte au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère
- 35 selon l'une des revendication 13 à 15.
29. Procédé de transformation des plantes pour les rendre résistantes aux maladies fongiques ou bactériennes, caractérisé en ce que l'on insère dans la plante au moins un fragment d'acide nucléique selon les revendications 1 à 9 ou un gène chimère selon les revendications 13 à 15.



30. Procédé selon l'une des revendications 28 ou 29, caractérisé en ce que le gène chimère est inséré au moyen d'un vecteur selon l'une des revendications 16 à 18.



1/2

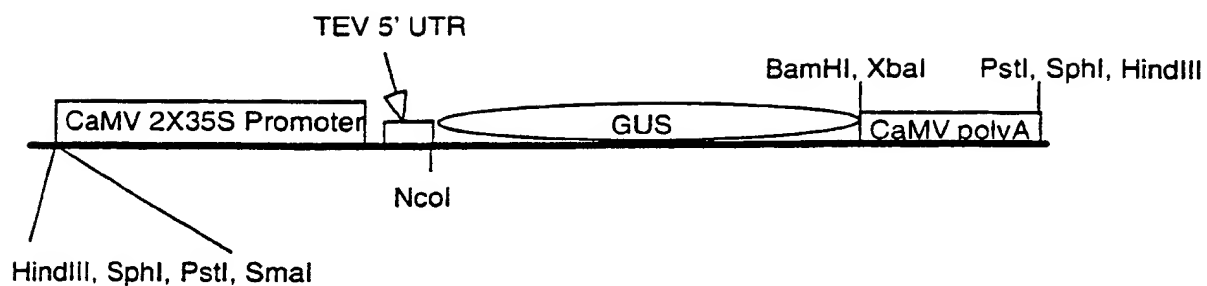


Fig. 1

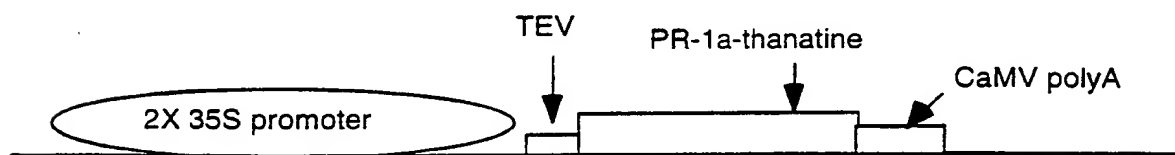


Fig. 2

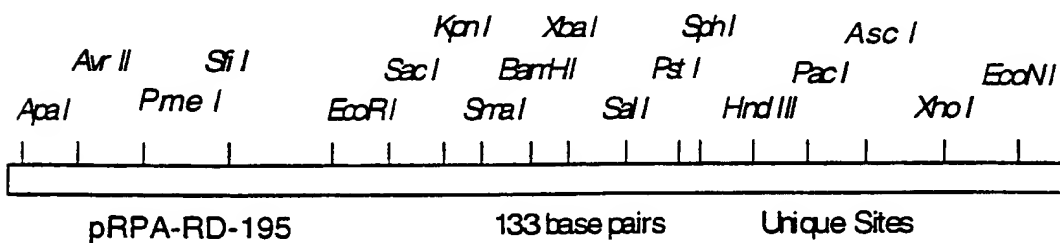
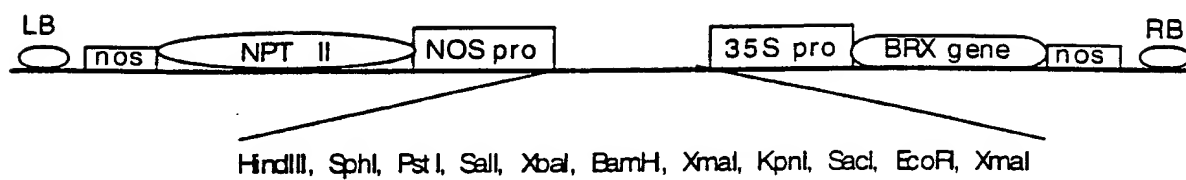
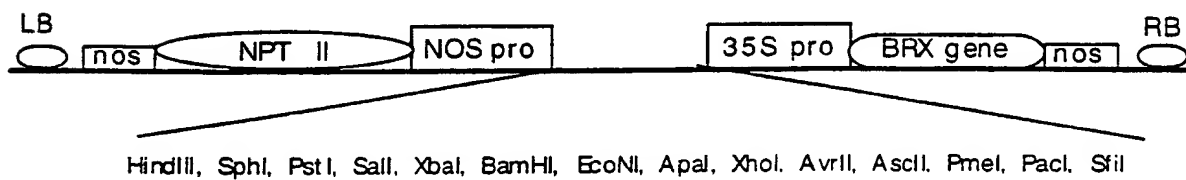


Fig. 3



2/2

**Fig. 4****Fig. 5**



## LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 13

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CHARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 1..33

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT AAG TGC  
Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly Lys Cys  
1 5 10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 63 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CHARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMPLACEMENT: 1..63

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT 48  
Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly  
1 5 10 15

AAG TGC CAG AGG ATG  
Lys Cys Gln Arg Met  
20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 98 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide





- (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMBLACEMENT: 1..63

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT GGT	48
Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr Gly	
1 5 10 15	
AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCCGG	98
Lys Cys Gln Arg Met	
20	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 106 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: double  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS  
(B) EMBLACEMENT: 12..101

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT	50
Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT	98
Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg	
15 20 25	
GCC GGCGA	106
Ala	
30	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 197 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire



(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 12...164

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GCGTCGACGC C ATG GGT TTC GTG CTT TTC TCT CAG CTT CCA TCT TTC CTT	50
Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu	
1 5 10	
CTT GTG TCT ACT CTT CTT CTT TTC CTT GTG ATC TCT CAC TCT TGC CGT	98
Leu Val Ser Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg	
15 20 25	
GCC GGT TCC AAG AAG CCA GTG CCA ATC ATC TAC TGC AAC AGG AGG ACT	146
Ala Gly Ser Lys Lys Pro Val Pro Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Thr	
30 35 40 45	
GGT AAG TGC CAG AGG ATG TGAGCTCGGC GAGGCGAACG TGTCGACGGA TCC	197
Gly Lys Cys Gln Arg Met	
50	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 75 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 1"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GCGTCGACGC GATGGGTTTC GTGCTTTTCT CTCAGCTTCC ATCTTTCCTT CTTGTGTCTA	60
CTCTTCTTCT TTTCC	75

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 72 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 2"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:



TCGCCGGCAC GGCAAGAGTA AGAGATCACA AGGAAAAGAA GAAGAGTAGA CACAAGAAGG 60

AAAGATGGAA GC 72

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 44 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 3"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGTTCCAAGA AGCCAGTGCC AATCATCTAC TGCAACAGGA CG 42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 97 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 4"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCGGATCCGT CGACACGTTT GCCTCGCCGA GCTCACATCC TCTGGCACTT ACCAGTCCTC 60

CTGTTGCAGT AGATGATTGG CACTGGC 87

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 85 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 5"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

AGGGCCCCCT AGGGTTTAAA CGGCCAGTCA GGCCGAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC 60

CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGC 85



## 5

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 110:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 66 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucl,iue

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 6"

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CCCTGAACCA GGCTCGAGGG CGCGCCTTAA TTAAAAGCTT GCATGCCTGC AGGTCGACTC 60

TAGAGG 66

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 7"

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGGCCAGTC AGGCCACACT TAATTAAGTT TAAACGCGGC CCCGGCGCGC CTAGGTGTGT 60

GCTCGAGGGC CCAACCTCAG TACCTGGTTC AGG 93

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 93 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonucléotide synthétique 8"

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CCGGCCTGAA CCAGGTACTG AGGTTGGGCC CTCGAGCACA CACCTAGGCG CGCCGGGGCC 60

CGGTTTAAAC TTAATTAAGT GTGGCCTGAC TGG 93





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 98/02375

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/62 C12Q1/68 A01H5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K C12Q A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 733 237 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 25 October 1996 cited in the application page 4, ligne 20-21; page 8, ligne 16 - page 9, ligne 11; revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM, P., ET AL.: "structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, February 1996, pages 1221-1225, XP002071913 see the whole document --- <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-30
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
° Special categories of cited documents :		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">18 February 1999</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25/02/1999</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Holtorf, S</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02375

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 732 345 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 4 October 1996 see page 5, line 15 - line 21 ---	1-30
A	EP 0 798 381 A (NAT INST AGROBIO RES) 1 October 1997 page 6, ligne 8-20; examples, revendications ---	1-30
A	WO 90 14098 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 29 November 1990 page 3, page 6, ligne 5 -18; page 6, ligne 34 - page 7, ligne9; examples, revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM P ET AL: "INSECT IMMUNITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 52, 30 December 1994, pages 33159-33163, XP002061373 see the whole document -----	1-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02375

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2733237	A	25-10-1996	NONE	
FR 2732345	A	04-10-1996	NONE	
EP 0798381	A	01-10-1997	JP 9252779 A	30-09-1997
			JP 10028487 A	03-02-1998
			CA 2198920 A	26-09-1997
WO 9014098	A	29-11-1990	AU 5662990 A	18-12-1990

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De, Je internationale No

PCT/FR 98/02375

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C07K14/435 C12N15/62 C12Q1/68 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K C12Q A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 733 237 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 25 octobre 1996 cité dans la demande page 4, ligne 20-21; page 8, ligne 16 - page 9, ligne 11; revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM, P., ET AL.: "structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, février 1996, pages 1221-1225, XP002071913 voir le document en entier ---	1-30

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non  
considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international  
ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de  
priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une  
autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à  
une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais  
postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la  
date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la  
technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe  
ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut  
être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité  
inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée  
ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive  
lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres  
documents de même nature, cette combinaison étant évidente  
pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Holtorf, S

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: e Internationale No  
PCT/FR 98/02375

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 732 345 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 4 octobre 1996 voir page 5, ligne 15 - ligne 21 ---	1-30
A	EP 0 798 381 A (NAT INST AGROBIO RES) 1 octobre 1997 page 6, ligne 8-20; exemples, revendications ---	1-30
A	WO 90 14098 A (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 29 novembre 1990 page 3, page 6, ligne 5 -18; page 6, ligne 34 - page 7, ligne 9; exemples, revendications ---	1-30
A	FEHLBAUM P ET AL: "INSECT IMMUNITY" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 52, 30 décembre 1994, pages 33159-33163, XP002061373 voir le document en entier -----	1-30

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 98/02375

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2733237 A	25-10-1996	AUCUN	
FR 2732345 A	04-10-1996	AUCUN	
EP 0798381 A	01-10-1997	JP 9252779 A	30-09-1997
		JP 10028487 A	03-02-1998
		CA 2198920 A	26-09-1997
WO 9014098 A	29-11-1990	AU 5662990 A	18-12-1990